

El magnetómetro por gradiente alternante de campo: una nueva herramienta para la caracterización de nanopartículas magnéticas en biofluidos y tejidos biológicos

V. Ferro Llanos^{1,2,4}, J.J. Serrano Olmedo^{1,2,4}, C. Maestú Unturbe^{1,2,4}, C. Sánchez López de Pablo^{1,2,4}, M.C. Maicas Ramos^{3,4}, C. Aroca Hernández-Ros^{3,4}, M.M. Sanz Lluch^{3,4}, F. del Pozo Guerrero^{1,2,4}

¹ Grupo de Bioingeniería y Telemedicina (GBT), Centro de Tecnología Biomédica (CTB), Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Madrid, España, {vferro, cmaestu, csanchez, fpozo}@gbt.tfo.upm.es, jjserran@etsit.upm.es

² Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, Madrid, España

³ Instituto de Sistemas Optoelectrónicos y Microtecnología (ISOM-GDM), UPM, Madrid, España, {maicas, caroca}@fis.upm.es, mmsanz@die.upm.es

⁴ Programa MADR.IB-CM de Biociencias de la Comunidad de Madrid

Resumen

Las aplicaciones que ofrecen las nanopartículas magnéticas basadas en sus interacciones con los campos magnéticos estáticos o variantes en el tiempo, son uno de los principales y más prometedores focos de investigación biomédica en la actualidad. La caracterización magnética de las partículas y de su comportamiento en el interior de materiales biológicos es un aspecto susceptible de numerosas mejoras, siendo además uno de los pasos preliminares fundamentales a la realización de cualquiera de los experimentos que las empleen. En este artículo se presenta una nueva herramienta que facilitará esta tarea, además de presentar futuras líneas de acción que ofrecerán nuevas posibilidades en el mundo de la nanobioingeniería, partiendo de una breve introducción teórica en la que se presentarán los principios físicos que se encuentran en la base de las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas.

1. Introducción

Las nanopartículas magnéticas ofrecen en la actualidad unas posibilidades altamente atractivas en el campo de la biomedicina, algunas de las cuales ya han demostrado su utilidad *in-vivo* tanto sobre animales como sobre pacientes humanos [1]. Aplicaciones como contraste para imagen por resonancia magnética ya son corrientes y se están llevando a cabo ensayos clínicos para aplicaciones antitumorales por hipertermia.

Con independencia de la complejidad estructural que las nanopartículas magnéticas puedan llegar a tener en función de su aplicación, su carácter magnético es el hecho distintivo que permite actuar sobre ellas desde el exterior. Por tanto, resulta imprescindible la caracterización de sus propiedades magnéticas a lo largo de su proceso de producción y luego en diversos momentos durante la experimentación para desarrollar las aplicaciones biomédicas. Es en este punto en el que el reciente magnetómetro de gradiente de campo alterno (AGFM) *MicroMag Model 2900 AGM System*[®] [2] de Princeton Measurements Corporation sobresale por sus prestaciones sobre otros sistemas en principio análogos. Destaca su posible utilización sobre tejidos biológicos, ya sea en muestras en las que también están presentes nanopartículas o midiendo elementos magnéticos que

podemos encontrar naturalmente como el hierro de las moléculas de hemoglobina o los magnetosomas presentes en el citoplasma de ciertas bacterias.



Figura 1. *MicroMag Model 2900 AGM System*

Antes de presentar las características del magnetómetro, se realizará un repaso a los principios físicos que rigen el comportamiento de toda partícula magnética y de los AGFM, lo que permitirá entender mejor cómo se comportan las nanopartículas y por lo tanto, comprender el porqué de la elección de este dispositivo y las ventajas que presenta para la caracterización de éstas. Finalmente, se incluirán algunos de los resultados preliminares obtenidos tras medidas sobre muestras sólidas y sobre muestras de glioblastomas humanos con nanopartículas infundidas. El objetivo de este artículo es justificar la utilidad del sistema *MicroMag Model 2900*[®], parte de la Plataforma de síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas del CIBER-BBN [3], para llevar a cabo esta caracterización y realizar medidas sobre muestras de tejidos biológicos.

2. Principios físicos [4]

Cuando un material es sometido a un campo magnético de intensidad \mathbf{H} , su respuesta es la *inducción magnética* \mathbf{B} , y ambas se relacionan a través del parámetro *permeabilidad*

del medio μ y de la magnetización del medio \mathbf{M} de la forma:

$$\mathbf{B} = \mu(\mathbf{H} + \mathbf{M}),$$

donde \mathbf{M} se define a su vez como el *momento magnético m* por unidad de volumen de un sólido:

$$\mathbf{M} = \mathbf{m} / V$$

Todo material presenta cierto comportamiento magnético, dependiente de su estructura atómica y su temperatura entre otros aspectos, pero comúnmente sólo se denominan medios magnéticos aquellos que presentan una magnetización \mathbf{M} más notable. Se conoce como *susceptibilidad magnética* al grado de magnetización que presenta un material cuando se encuentra sometido a la influencia de un campo magnético \mathbf{H} :

$$\mathbf{M} = \chi \mathbf{H},$$

donde χ es la *susceptibilidad magnética volumétrica*, parámetro que puede medirse directamente con el AGFM. Esta expresión incorpora un hecho de gran importancia para la magnetometría: el momento medido es lineal respecto de sus componentes. Es decir, las distintas estructuras materiales presentes en una muestra contribuyen de forma independiente sumando sus efectos a la medida.

Hay ciertos materiales que son capaces de mostrar un comportamiento magnético espontáneo mucho mayores que el resto en ausencia de excitación. Como su susceptibilidad depende de \mathbf{H} , la aparente relación lineal anterior entre el campo magnético y la magnetización se convierte en realidad en una forma sigmoidea muy característica, apareciendo histéresis en algunos casos si se mide \mathbf{M} haciendo recorrer a \mathbf{H} un cierto margen en los dos sentidos.

Los así denominados ciclos de histéresis variarán su forma para un mismo material magnético según el tamaño de las partículas. El caso de tamaños muy pequeños (de decenas de nanómetros o incluso menor, rangos entre los que se encuentran muchas de las nanopartículas magnéticas), es especialmente relevante porque presenta el fenómeno de superparamagnetismo. Presenta características del ferromagnetismo clásico (gráfica sigmoidea) y del paramagnetismo (aumenta \mathbf{M} según aumenta \mathbf{H}).

La principal ventaja de los AGFM (o AGM) frente a otro tipo de magnetómetros, como los de muestra vibrante (VSM), es su alta sensibilidad, lo que ha permitido que tengan una gran aceptación hoy en día en la realización de medidas magnéticas. A cambio, se ha de ser mucho más cuidadoso en el proceso de medición.

En un AGFM, la muestra suele colocarse en un portamuestras que contiene un transductor piezoeléctrico que oscila cuando se ha sometido al elemento que se desea caracterizar a un campo magnético alterno superpuesto al campo magnético continuo de un electroimán. Debido a esta configuración, el ruido de base que tienen es mucho menor que el de otros magnetómetros, lo que convierte al AGM en el dispositivo idóneo para la medición de muestras con

nanopartículas, debido al bajo nivel de señal que presentan algunas de ellas.

3. Caracterización de las nanopartículas magnéticas

En el caso de estas nanopartículas es preciso conocer las propiedades magnéticas de las muestras biológicas en que van a ser introducidas las nanopartículas y del conjunto de ambas, que es justo lo que nos permite realizar el magnetómetro que presentamos. Substrayendo las primeras de las segundas, se puede conocer la contribución al magnetismo del tejido por parte de las nanopartículas introducidas artificialmente en él. El conocimiento de esta contribución es de utilidad, en general, para correlar los resultados experimentales de los ensayos de aplicaciones biomédicas de las nanopartículas con la presencia de tipos concretos de nanopartículas por composición, forma, etc. Citaremos a continuación ejemplos de aplicaciones para señalar las posibilidades de este dispositivo.

3.1. Selección del tiempo de medida para distribución guiada de fármacos con nanopartículas

Debido al tamaño de las nanopartículas, es fácil suponer que la mayor parte de ellas presentarán un comportamiento superparamagnético. Como se ha demostrado a lo largo de los años [5], el superparamagnetismo está basado en una ley de activación del *tiempo de relajación* τ de la magnetización neta de la partícula, que depende de la temperatura y una barrera energética que indica qué energía debe superarse para que el momento se invierta. Si bien es cierto que la temperatura es muy importante (y más en partículas pequeñas en las que la barrera energética es del mismo orden que la temperatura ambiente), es igual de relevante el tiempo de medida τ_m de la técnica experimental usada:

- Si $\tau \ll \tau_m$, la inversión es tan rápida respecto al tiempo de medida que en ausencia de campo \mathbf{H} externo la media temporal del momento neto de las partículas es cero, por lo que las partículas aparentan ser paramagnéticas.
- Si $\tau \gg \tau_m$, el tiempo de medida es tan pequeño que la inversión no se aprecia, por lo que el comportamiento observado es cuasi-estático.

Imaginemos una aplicación biomédica como la distribución de medicamentos mediante una terapia de guiado electromagnético en la que un componente citotóxico se une a una nanopartícula portadora mediante una cubierta biocompatible. El complejo medicamento-portador suele formar un ferrofluido que se inyecta en el torrente sanguíneo. Como en la sangre encontramos partículas que tienen una respuesta paramagnética (como la ya mencionada hemoglobina) y diamagnética (susceptibilidad negativa, aunque pequeña, de ciertas proteínas que se encuentran en el interior de los vasos sanguíneos compuestas de carbono, nitrógeno y oxígeno), es muy importante haber caracterizado antes la respuesta magnética de la sangre. Así, hay que escoger un tiempo de medida τ_m correcto al medir las nanopartículas, para que no se confunda el paramagnetismo de éstas últimas

con el de las partículas sanguíneas (pese a que la respuesta de las partículas externas siempre es mayor que la de las sanguíneas); también para predecir el comportamiento de todos los elementos ante campos externos de alto gradiente que se encargan de concentrar las nanopartículas en ciertas zonas (sólo nos interesa concentrar el ferrofluido). Gracias a las especificaciones de *MicroMag Model 2900*[®], con una rapidez de medida de hasta 100ms por punto, podríamos encontrar el τ_m adecuado para caracterizar no sólo las nanopartículas sino también el complejo en el interior del torrente sanguíneo, lo que no se podría conseguir con otros magnetómetros actuales.

3.2. Caracterización de uniones en etiquetado de células y separación magnética

Otra aplicación de interés biomédico es el etiquetado de células y separación magnética, que ya se usa de manera habitual en muchos laboratorios para separar células tumorosas de la sangre [6], etiquetar células sanguíneas de la serie roja [7] o detectar parásitos de malaria en muestras [8]. En este caso las nanopartículas tienen que estar recubiertas de moléculas bioespecíficas que permitirán la unión con la célula o molécula diana. Midiendo muestras en las que se hayan producido estas uniones, podemos estudiar las propiedades de las hibridaciones, lo que es muy importante para el segundo paso de este tipo de aplicaciones, puesto que para la separación se suelen emplear regiones con alto gradiente de campo magnético y queremos que las ligaduras se mantengan para que en dicha zona se concentren los complejos nanopartícula-células diana y no se rompan, lo que sólo acumularía nanopartículas.

Se ha demostrado la utilidad de diagramas FORC (*First order reversal curve*) para caracterizar interacciones en sistemas de partículas magnéticas pequeñas [9] u otras aplicaciones similares [10], siendo de igual utilidad en este caso y permitiendo el AGM mencionado realizar medidas de gran precisión en este sentido.

Además, en este tipo de experimentos suele ser muy útil que el tamaño de las partículas sea muy pequeño para reducir la probabilidad de que el material magnético interfiera demasiado con futuras medidas sobre las células separadas. Por lo tanto, las ventajas que se presentaron en la subsección anterior sobre el tiempo de medida siguen siendo vigentes en estas aplicaciones.

3.3. Modularidad en otras aplicaciones biomédicas

Otra de las ventajas que presenta el dispositivo que presentamos es que dispone de los recursos suficientes para cambiar las características de los experimentos a realizar, obteniéndose así nuevos datos en nuestras investigaciones.

El ejemplo más intuitivo que podemos mencionar es el uso de nanopartículas en experimentos de hipertermia. Como mencionan distintos autores [11], la frecuencia y la potencia del campo magnético usado para generar el calentamiento está limitado por la respuesta fisiológica a campos magnéticos de alta frecuencia. Se suele concretar que el rango apropiado de frecuencias y amplitudes que se

pueden utilizar en estas aplicaciones ronda los 0,05-1,2 MHz y de 0 a 15 kA m⁻¹. Pero podríamos plantearnos qué ocurriría si en vez de introducir una excitación sinusoidal la señal de entrada fuese pulsada. Como se ha mencionado en el párrafo anterior, el AGM que estamos usando permite realizar experimentos de este estilo y hacer pruebas realmente novedosas en la caracterización de las uniones de nanopartículas con tejidos biológicos.

4. Resultados preliminares: ejemplos

El magnetómetro ha sido puesto en operación cuarenta días antes de la finalización de este documento, por lo que solo es posible presentar trabajos preliminares que apuntan la capacidad del instrumento, pero que todavía no la muestran del todo. De hecho, una de las primeras actividades que se están llevando a cabo es la adaptación de su portamuestras para la medida de fluidos en condiciones óptimas ya que el sistema fue diseñado para muestras sólidas. La necesidad de medidas magnéticas en biofluidos es relativamente reciente y no hay todavía demasiada experiencia acumulada.

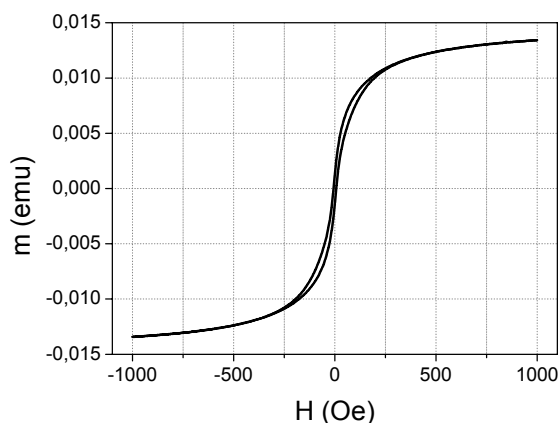


Figura 2. Medidas convencionales (en seco) de NMP's de Níquel

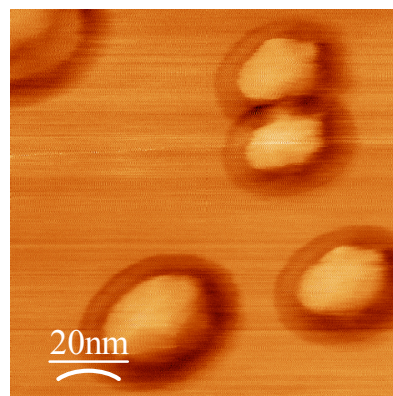


Figura 3. Nanopartículas de Níquel crecidas por pulverización catódica (Imagen procesada con WSxM, Nanotec Electrónica S.L.)

En primer lugar, en la figura 2 se muestra un ciclo de histéresis de material en forma de polvo. Se trata de nanopartículas magnéticas crecidas dentro del grupo de investigación mediante una técnica de pulverizado atómico de un blanco de alta pureza y posterior

agregación de los átomos para formar partículas, todo ello en atmósfera inerte de baja presión. Las nanopartículas mostradas son de Níquel con un tamaño medio en torno a 12nm (ver figura 3).

En segundo lugar presentamos resultados de la medida de la magnetización de muestras de cultivos de glioblastoma humano en donde han sido infundidas nanopartículas comerciales PMAV-250 y PMAV-100 de Kisker®: magnetita de 250 y 100 nanómetros de diámetro respectivamente, recubiertas de dextrano y suspendidas en agua. En la figura 4 se presenta una comparación entre las medidas de muestras con nanopartículas, sin nanopartículas y el portamuestras sin muestra.

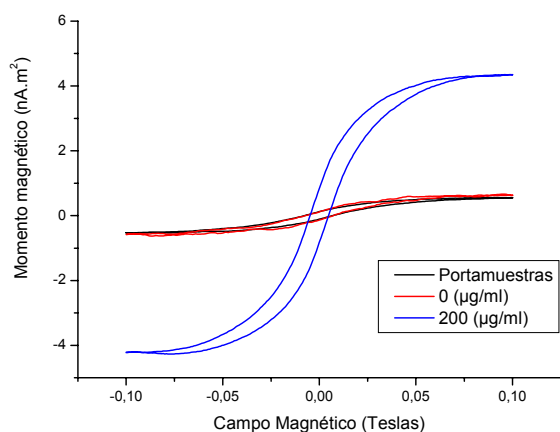


Figura 4. Cultivos de glioblastomas humanos con NPM's (\varnothing 250nm, 200 $\mu\text{g/ml}$): el magnetismo residual del portamuestras es inferior al de las NPM's.

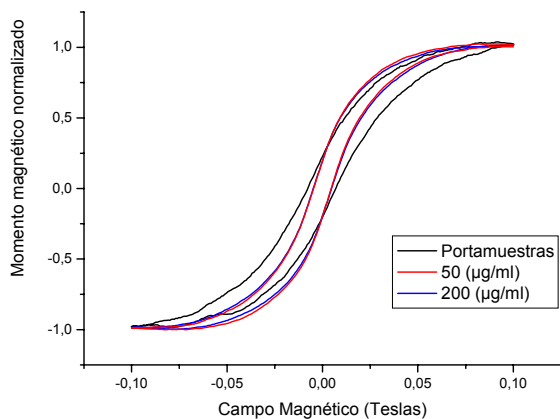


Figura 5. Resultados normalizados (\varnothing 250nm)

Puede observarse como la señal del portamuestras es prácticamente idéntica a la del cultivo celular sin infusión de nanopartículas, lo que demuestra que éste no presenta contribución alguna al momento magnético. Por tanto, el ciclo del cultivo infundido tiene contribución del portamuestras y de las nanopartículas en exclusiva.

En la figura 5 se han normalizado las señales obtenidas para el portamuestras sin nada y para muestras con cultivos con nanopartículas en concentraciones de 50

$\mu\text{g/ml}$ y 200 $\mu\text{g/ml}$. Aquí no se buscaba apreciar diferencias de nivel, sino de comportamiento. En efecto, la forma del ciclo de histéresis es casi idéntica en las medidas en las que están presentes las nanopartículas y distinta cuando no están, revelando que el material magnético origen de uno y otro es distinto. También se revela que la concentración de nanopartículas no modifica su susceptibilidad.

5. Conclusiones

El magnetómetro de gradiente de campo magnético alternante puede caracterizar el comportamiento magnético de muestras biológicas, incluidos fluidos. Los procedimientos para la obtención de toda la información relevante del sistema fluido más nanopartículas magnéticas es un trabajo todavía por realizar ya que, en buena medida, depende de las características mecánicas y reológicas de los fluidos matriz.

Referencias

- [1] Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol 36, 2003, pp 167-81 (ISSN: 0022-3727).
- [2] Página web dedicada al magnetómetro AGM MicroMag Model 2900 de Princeton Measurements Corporation. <http://www.princetonmeasurements.com/twohds03.htm> (Consultada: Junio 2008)
- [3] Página web del Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BNN). <http://www.ciber-bnn.es> (Consultada: Junio 2008)
- [4] Jiles D. Introduction to Magnetism and Magnetic Materials. Second Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, 1998 (ISBN: 0412798603)
- [5] Brown W F Jr. Thermal fluctuations of a single-domain particle. *Physical Review*, vol 130, sup 5, 1963, pp 1677-86 (ISSN: 1050-2947).
- [6] Liberti PA, Rao CG, Terstappen LWMM. Optimization of ferrofluids and protocols for the enrichment of breast tumor cells in blood. *Journal of magnetism and magnetic materials*, vol. 225, sup 1, 2001, pp 301-7 (ISSN: 0304-8853).
- [7] Seesod N, Nopparat P, Hedrum A, Holder A, Thaithong S, Uhlen M, Lundeberg J. An integrated system using immunomagnetic separation, polymerase chain reaction, and colorimetric detection for diagnosis of Plasmodium Falciparum. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol 56, sup 3, 1997, pp 322-8 (ISSN: 0002-9637).
- [8] Paul F, Melville D, Roath S, Warhurst D. A bench top magnetic separator for malarial parasite concentration. *IEEE Transactions on Magnetics*, vol 17, sup 6, 1981, pp 2822-4 (ISSN: 0018-9464).
- [9] Pike CR, Roberts AP, Verosub KL. Characterizing interactions in fine magnetic particle systems using first order reversal curves. *Journal of Applied Physics*, vol 85, sup 9, 1999, pp 6660-7 (ISSN: 0021-8979)
- [10] Pike CR, Fernández A. An investigation of magnetic reversal in submicron-scale Co dots using first order reversal curve diagrams. *Journal of Applied Physics*, vol 85, sup 9, 1999, pp 6668-76 (ISSN: 0021-8979)
- [11] Oleson JR, Cetas TC, Corry PM. Hyperthermia by magnetic induction: Experimental and theoretical results for coaxial coil pairs. *Radiation Research*, vol 95, sup 1, 1983, pp 175-86 (ISSN: 0033-7587)